

# VU Research Portal

## Orchestrating Efficacy of Synaptic Transmission

Wierda, K.D.B.

2008

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Wierda, K. D. B. (2008). *Orchestrating Efficacy of Synaptic Transmission: The role of Munc18*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam]. Vrije Universiteit.

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

# **Nederlandse Samenvatting**

## **Organiseren van efficiënte neuronale communicatie:**

### **De rol van Munc18**

Eind 19e eeuw begon onze kennis over de werking van het centraal zenuwstelsel in een stroomversnelling te geraken door de ontwikkeling van de zogenaamde 'neuron theorie'. Deze theorie postuleerde dat het zenuwstelsel is opgebouwd uit individuele zenuwcellen (neuronen) die met elkaar communiceren via gespecialiseerde contactplaatsen: de 'synapsen'. Inderdaad worden neuronen geïsoleerd van hun omgeving door een wand (het celmembraan) welke bestaat uit vetachtige moleculen (lipiden). Onder normale (passieve) omstandigheden handhaaft een neuron een elektrische geladenheid over zijn celmembraan, waarbij de binnenkant van het celmembraan negatief geladen is ten opzichte van de buitenkant (de 'rust membraan potentiaal'). Naast lipiden bevat het celmembraan van neuronen ook kanalen die kunnen openen en sluiten, afhankelijk van de lading over het membraan. Activatie van een neuron leidt tot een ladingverschuiving waarbij de binnenkant van het membraan minder negatief en zelfs positief wordt (depolarisatie). Dergelijke depolarisaties van het celmembraan openen de ladingsgevoelige kanalen die doorlaatbaar zijn voor positieve ionen (natrium en calcium). Hierdoor ontstaan nog grotere depolariserende stromen, met als gevolg dat nabij gelegen kanalen ook zullen openen. Deze positieve terugkoppeling leidt uiteindelijk tot het voorgeleiden van een elektrisch signaal over het celmembraan. Naast kanalen die het neuronale celmembraan depolariseren, zijn er ook ladingsgevoelige kanalen die het membraan 'repolariseren' (kalium kanalen) en hierdoor het neuron weer in zijn passieve uitgangssituatie brengen waarbij alle kanalen weer gesloten zijn en de binnenkant van het membraan negatief geladen is. Deze aaneenschakeling van kanaal activaties maken een zeer snelle voortgeleiding van elektrische signalen over het membraan van een neuron mogelijk (zogenaamde 'actiepotentiaal'), maar zijn niet geschikt voor communicatie tussen zenuwcellen.

Voor communicatie tussen zenuwcellen wordt gebruik gemaakt van chemische boodschappers, moleculen die een specifieke boodschap overdragen van het ene naar het andere neuron. Om een boodschap over te kunnen dra-

gen aan een volgend neuron, bevat de 'zendende zenuwcel' blaasjes die gevuld zijn met boodschapper moleculen welke kunnen worden afgegeven wanneer dit neuron actief is. Om dergelijke boodschappen te kunnen waarnemen, bezitten 'ontvangende zenuw-cellen' receptoren in het celmembraan die de boodschappermoleculen kunnen binden. Deze gespecialiseerde overdrachtsplaats van het elektrische signaal wordt een 'synapse' genoemd. De afstand tussen de neuronale celmembranen binnen een synapse is slechts 20 nanometer (0.00002 millimeter) waardoor de afgegeven boodschapper moleculen een grote kans hebben om gevangen te worden door de receptoren van de ontvangende cel. Het binden van de boodschappermoleculen aan deze receptoren leidt tot het openen van kanalen in het membraan van het ontvangende neuron. Ook door deze kanalen stromen geladen ionen waardoor een klein lokaal elektrisch signaaltje (synaptische depolarisatie) wordt opgewekt in het ontvangende neuron. Dergelijke synaptische signaaltjes kunnen leiden tot volwaardige activatie van het ontvangende neuron (opwekken van een actiepotentiaal) welke op zijn beurt weer synaptische signalen kan doorgeven aan volgende zenuwcellen. Dergelijke samenhangende zenuwcel activaties leiden tot efficiënte verwerking van (nieuwe) informatie binnen neuronale netwerken en vormen de basis voor het vermogen tot zien, horen en ruiken, maar ook voor hogere hersenfuncties zoals leren, geheugen, cognitie, communicatie en emotie.

Om afgifte van boodschappermoleculen mogelijk te maken moeten de blaasjes kunnen versmelten met het celmembraan. Hiertoe moeten de blaasjes eerst aan de binnenkant van het celmembraan afmeren of aanleggen (ook wel 'docken' genoemd). Vervolgens moeten de blaasjes gereed gemaakt worden om met het plasmamembraan te kunnen versmelten, een rijpingsproces wat ook wel 'priming' wordt genoemd. Gerijpte blaasjes liggen klaar voor fusie met het plasmamembraan in het zendende synaptische compartiment ('presynapse'), maar worden over het algemeen pas afgegeven op het moment dat het zendende neuron actief is. Tijdens presynaptische activatie worden spanningsgevoelige calcium kanalen geopend waardoor calcium ionen de presynapse in stromen. Aangezien calcium door neuronen wordt gebruikt als 'fusie signaal' voor blaasjes, leidt een dergelijke stijging in de presynaptische calcium concentratie tot een extreem grotere kans op versmelten van een met boodschappermoleculen gevuld blaasje. Bij een succesvolle fusie wordt het elektrische signaal doorgegeven aan het volgende ('postsynaptische') neuron: synaptische signaaloverdracht (of synaptische transmissie).

Om het brein efficiënt te laten functioneren en adapteren aan allerlei (nieuwe) omstandigheden is het noodzakelijk dat de communicatie tussen hersencellen ‘betrouwbaar onbetrouwbaar’ is: onder gelijke omstandigheden constant pres-terend, maar tevens de mogelijkheid hebben om adaptief (en juist) te reageren op nieuwe situaties. Hiertoe bevat de presynapse een complexe fusie machinerie bestaande uit tientallen eiwitten, welke gezamenlijk de (veranderingen in) efficiëntie van synaptische transmissie controleren. Er zijn vanaf eind 20e eeuw talloze factoren geïdentificeerd die in meer of mindere mate de afgifte van neurotransmitters reguleren en hiermee dus een bijdrage leveren aan de activiteit van neuronale netwerken. Eén component van de machinerie onderscheidt zich door zijn absolute noodzaak voor neurotransmitter afgifte. We weten dat dit eiwit (Munc18-1) essentieel is voor neuronale communicatie, maar zijn specifieke rol in neurotransmissie is tot op heden nog niet bekend. Het doel van mijn promotieonderzoek was om meer inzicht te krijgen in de specifieke rol van Munc18-1 in gereguleerde synaptische neurotransmissie. De resultaten van dit onderzoek zijn beschreven in dit proefschrift.

In het tweede hoofdstuk (eerste experimentele hoofdstuk) wordt het effect van verschillende Munc18-1 expressie niveaus op de efficiëntie van synaptische transmissie in gekweekte neuronen bestudeerd. Voor het verhogen van de Munc18-1 expressie wordt gebruik gemaakt van virussen die extra *munc18-1* genen introduceren in gekweekte neuronen. Van deze extra genkopieën kan (ongecontroleerd) nieuw Munc18-1 eiwit worden gemaakt, waardoor de concentratie Munc18-1 toeneemt t.o.v. normale cellen (Munc18-1 overexpressie). Om het effect van verlaagde Munc18-1 concentratie te bestuderen, is gebruik gemaakt van zenuwcellen die slechts één *munc18-1* gen bevatten. In deze cellen is de Munc18-1 concentratie ongeveer 50% lager dan in normale zenuwcellen (Munc18-1 onderexpressie). Uit deze studie blijkt dat Munc18-1 beschikbaarheid het uithoudings- en herstelvermogen van synapsen reguleert: Munc18-1 controleert synaptische efficiëntie tijdens periodes van verhoogde activiteit en zorgt ervoor dat nieuwe blaasjes sneller klaar zijn om afgegeven te worden. Verder bepaald Munc18-1 het aantal gedockte blaasjes in presynaptische uiteinden wat waarschijnlijk (gedeeltelijk) ten grondslag ligt aan de Munc18-1 geïnduceerde functionele veranderingen in uithoudings- en herstelvermogen. Samenvattend wordt synaptische efficiëntie direct bepaald door Munc18-1 beschikbaarheid en is daarmee mogelijk van potentieel belang voor hersenprocessen zoals leren en geheugen.

Het derde hoofdstuk valideert een nieuwe experimentele methode die in de volgende hoofdstukken gebruikt wordt om de moleculaire rol van Munc18-1 in secretie te onderzoeken. Munc18-1 is essentieel voor gereguleerde secretie: zenuwcellen die zo genetisch gemanipuleerd zijn dat er geen Munc18-1 meer tot expressie komt zijn volkomen stil. Daarnaast gaan dergelijke ‘*munc18-1* knock-out’ zenuwcellen kort na kweken dood, wat lijkt te wijzen op een belangrijke rol voor Munc18-1 in het voortbestaan van zenuwcellen. Dit hoofdstuk beschrijft de mogelijkheid om ‘*munc18-1* knock-out’ zenuwcellen te laten overleven door het *munc18-1* gen na het kweken van knock-out neuronen alsnog te introduceren. Het *munc18-1* gen wordt met behulp van virussen geïntroduceerd in de ‘*munc18-1* knock-out’ zenuwcellen en van deze genen wordt Munc18-1 eiwit gemaakt. In dit hoofdstuk wordt beschreven dat dergelijke getransfecteerde ‘*munc18-1* knock-out’ zenuwcellen blijven leven en dat secretie van synaptische blaasjes volkomen is hersteld. In de volgende hoofdstukken wordt deze experimentele methode (virale ‘rescue’ van *munc18-1* knock-out neuronen) gebruikt om de rol van Munc18-1 in gereguleerde secretie verder te bestuderen.

In hoofdstuk vier wordt een mutant van Munc18-1 onderzocht welke niet meer gemodificeerd (gefosforyleerd) kan worden door het eiwit ‘proteïne kinase C’ (PKC). Sinds lange tijd lijkt PKC een belangrijke component in de (activiteits-afhankelijke) regulatie van synaptische efficiëntie (‘synaptische augmentatie’), maar tot op heden zijn er nog geen essentiële PKC substraten gevonden om synaptische augmentatie te induceren. In dit hoofdstuk introduceren we (viraal) een gemuteerde variant van het *munc18-1* gen in ‘*munc18-1* knock-out’ neuronen. Door specifiek het PKC fosforylatie domein te muteren en vervolgens de mate van herstel van secretie te bestuderen, is het mogelijk de rol van Munc18-1 fosforylatie door PKC in het reguleren van synaptische afgifte te achterhalen. Dit hoofdstuk beschrijft een essentiële rol van PKC afhankelijk Munc18-1 fosforylatie in het induceren van synaptische augmentatie. Tevens is PKC afhankelijke fosforylering van Munc18-1 essentieel voor het handhaven van synaptische efficiëntie tijdens periodes van verhoogde synaptische activiteit en versneld synaptisch herstel. Daarnaast induceert PKC afhankelijk Munc18-1 fosforylatie een redistributie van blaasjes in presynaptische uiteinden, naar de afgifte plekken toe. Behalve deze PKC afhankelijke route is er nog een route (via het eiwit Munc13) die essentieel is voor synaptische augmentatie. In dit hoofdstuk postuleren wij dat zowel PKC-afhankelijke (Munc18-1 fosforylatie) als PKC-onafhankelijke (Munc13) routes actief moeten zijn om synaptische augmentatie te induceren. Samengevat is PKC afhankelijke Munc18-1 fosforylatie essentieel voor synaptische augmentatie en

speelt een cruciale rol in de regulatie van korte termijn plasticiteit in synaptische communicatie.

In het vijfde hoofdstuk wordt onderzocht bij welk proces of welke processen Munc18-1 primair betrokken is. Eerdere onderzoeken op verschillende celtypen hebben uitgewezen dat Munc18-1 een essentiële rol speelt bij het afmeren van blaasjes aan het celmembraan ('vesicle docking'). Een interessante uitzondering was de normale hoeveelheid afgemeerde blaasjes in zenuwcellen. De combinatie van normaal gedockte blaasjes met een blokkade in secretie leidt tot de hypothese dat Munc18-1 nog een essentiële rol heeft in neurotransmissie. Om een mogelijke tweede Munc18-1 specifieke rol in secretie te onderzoeken vergelijken we hier in hoeverre Munc18-2 of Munc18-3, beide isoformen van Munc18 die normaal niet tot expressie komen in zenuwcellen, neuronale secretie kunnen herstellen. Ondanks dat docking van blaasjes volledig normaal is in '*munc18-1* knock-out' neuronen die niet neuronale Munc18 isoformen tot expressie brengen, blijft functionele secretie zeer gebrekkig. Uit dit onderzoek blijkt dat Munc18-1 niet alleen betrokken is bij het afmeren van blaasjes aan het celmembraan (docking), maar heeft het tevens een belangrijke rol in het gereedmaken van blaasjes voor secretie ('priming'). Deze priming functie kan niet worden overgenomen door andere (niet neuronale) Munc18 isoformen.

In hoofdstuk zes wordt onderzocht wat de rol is van Munc18-1/Syntaxin-1 binding in synaptische secretie. Syntaxin-1 is één van de drie eiwitten die gezamenlijk het eigenlijke fuseren van vesicle- en celmembraan tijdens secretie mogelijk maakt. De sterke binding tussen Munc18-1 en Syntaxin-1 is al enkele decennia bekend, maar over de functionele rol van deze interactie bestaat nog steeds veel discussie. Verwijderen van het Munc18-1 eiwit leidt tot stille zenuwcellen, wat een duidelijke positieve rol voor Munc18-1 in secretie aanduidt. Aan de andere kant is bekend dat Syntaxin-1 gebonden aan Munc18-1 niet kan integreren in het trio-eiwit complex wat noodzakelijk is voor fusie: een duidelijke negatieve rol van Munc18-1 in gereguleerde secretie. Hier onderzoeken we herstel van secretie in '*munc18-1* knock-out' neuronen die getransfekteerd zijn met een mutant van Munc18-1 die sterk gereduceerde affiniteit heeft voor Syntaxin-1. Tot onze verassing lijkt een sterke affiniteit tussen Munc18-1 en Syntaxin-1 een belangrijke rol te hebben bij synapse formatie en/of stabilisatie, maar niet voor gereguleerde secretie. In vervolg onderzoek zal deze mutant gebruikt worden om de rol van Munc18-1 in neuronale ontwikkeling te onderzoeken, zonder bijkomende Munc18-1 afhankelijke effecten op secretie.

Uit de resultaten van deze studie kan worden geconcludeerd dat Munc18-1 essentieel is voor het reguleren van synaptische efficiëntie. Ten eerste is synaptische efficiëntie en herstel cruciaal afhankelijk van Munc18-1 beschikbaarheid. Ten tweede is PKC afhankelijke Munc18-1 fosforylatie van cruciaal belang voor (activiteitsafhankelijke) regulatie van synaptische efficiëntie (zogenoemde 'short-term neuronal plasticity'), wat ten grondslag ligt aan hogere hersenfuncties als leren en geheugen. Verder kan worden geconcludeerd dat Munc18-1 niet alleen betrokken is bij het afmeren van blaasjes ('docken'), maar ook van essentieel belang is voor het gereedmaken van blaasjes voor fusie met het celmembraan ('priming'). Bovendien blijkt Munc18-1 een belangrijke rol te spelen in synapse formatie en/of stabilisatie en deze rol is afhankelijk van een sterke binding met Syntaxin-1. In conclusie heeft deze studie een aanzienlijke bijdrage geleverd aan het huidige inzicht in de rol van Munc18-1 in gereguleerde synaptische secretie.